

TGIF反义寡核苷酸对胃癌细胞增生和凋亡的影响

胡忠良, 文继舫, 柳洋, 王宽松, 郑晖, 傅春燕

胡忠良, 文继舫, 柳洋, 王宽松, 郑晖, 傅春燕, 中南大学基础医学院病理学教研室 湖南省长沙市 410078
胡忠良, 男, 1973-02-05 生, 湖南省衡山县人, 汉族. 1997 年湖南医科大学学士, 中南大学基础医学院病理学教研室在职博士生, 主要从事胃肠肿瘤研究. 项目负责人: 文继舫, 410078, 湖南省长沙市湘雅路 88 号, 中南大学基础医学院病理学教研室. jifangwen@hotmail.com
电话: 0731-2650400 传真: 0731-2650400
收稿日期: 2003-07-15 接受日期: 2003-08-28

Effects of TGIF antisense oligonucleotide on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells

Zhong-Liang Hu, Ji-Fang Wen, Yang Liu, Kuan-Song Wang, Hui Zhen, Chun-Yan Fu

Zhong-Liang Hu, Ji-Fang Wen, Yang Liu, Kuan-Song Wang, Hui Zhen, Chun-Yan Fu, Department of Pathology, Basic Medical Institute, Central South University, Changsha 410078, Hunan Province, China
Correspondence to: Ji-Fang Wen, Department of Pathology, Basic Medical Institute, Central South University, 88 Xiangya Road, Changsha 410078, Hunan Province, China. jifangwen@hotmail.com
Received: 2003-07-15 Accepted: 2003-08-28

Abstract

AIM: TGIF (TG interacting factor) can inhibit both TGF- β and retinoid signaling pathways, moreover, the activation of MAPK pathway can lengthen its half life. However, its role in carcinogenesis is still unclear. Thus we attempt to investigate the effect of TGIF antisense oligodeoxynucleotide (ASDON) on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells.

METHODS: After gastric carcinoma cells, SGC-7901, were transfected with TGIF ASDON, we analyzed the transfect efficiency by RT-PCR, its proliferation by MTT method, cell cycle and apoptosis rate via flow cytometer.

RESULTS: After transfection with TGIF ASDON, the proliferation of SGC-7901 cells was partially inhibited, and its inhibitory rate was increased to 20.4% at 72h, whereas it had no effect on cell cycle and apoptosis of SGC-7901 cells. Followed by the treatment of TGF- β 1, the growth rate of cells transfected with TGIF ASDON was distinctly reduced by 30%, and the content of G1 phase cells increased more obviously compared with the cells transfected with mutated oligonucleotides or untransfected cells.

CONCLUSION: TGIF can resist the negative regulation of TGF- β 1 over proliferation and cell cycle. Most of tumor cells and interstitial cells can secrete TGF- β 1, and tumor cells may resist the TGF- β 1 mediated growth inhibition via TGIF, leading to the progression and even metastasis of tumor.

Hu ZL, Wen JF, Liu Y, Wang KS, Zhen H, Fu CY. Effects of TGIF antisense oligonucleotide on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):530-532

摘要

目的: TGIF (TG interacting factor) 是 TGF- β 和视黄醛信号传导通路的抑制分子, 且 MAPK 通路的活化能延长其半衰期, 但他在肿瘤发生中的作用尚不清楚, 本研究旨在探讨 TGIF 反义寡核苷酸对胃癌细胞增生和凋亡的影响。

方法: 将 TGIF 反义寡核苷酸瞬时转染胃癌细胞株 SGC-7901, RT-PCR 检测转染效率, MTT 法检测胃癌细胞的增生速度, 流式细胞术分析转染细胞的细胞周期和凋亡率的变化。

结果: SGC-7901 细胞转染 TGIF 反义寡核苷酸后, 细胞增生受到部分抑制, 72h 后, 他的抑制率达 20.4%, 但细胞的凋亡和细胞周期分布无明显改变. TGF- β 1 处理后, 与突变寡核苷酸转染组细胞和未转染组细胞相比, TGIF 反义寡核苷酸转染的 SGC-7901 细胞的增生受到明显抑制 (30%), G1 期细胞含量增加更明显。

结论: TGIF 能抑制 TGF- β 1 对细胞生长和细胞周期的负调控作用, 多数肿瘤细胞和间质细胞能分泌 TGF- β 1, 这些肿瘤细胞有可能利用 TGIF 甚至少量 TGIF, 抑制 TGF- β 对自身的生长抑制作用, 从而促进肿瘤的发生、发展与转移。

胡忠良, 文继舫, 柳洋, 王宽松, 郑晖, 傅春燕. TGIF 反义寡核苷酸对胃癌细胞增生和凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2004;12(3):530-532
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/530.asp>

0 引言

胃癌是一种严重威胁我国人民生命健康的常见肿瘤, 但其确切的发病机制尚不清楚^[1-8]. 目前国内外的研究均表明, 多数肿瘤丧失了 TGF- β 介导的生长抑制作用, 胃癌也不例外^[9]. TGIF (TG-interacting factor, TGIF) 能抑制 TGF- β 信号通路^[10-13]. MAPK 通路对 TGIF 的磷酸化使 TGIF 的半衰期延长, TGIF 蛋白浓度升高^[14]; 且 c-Jun 能增强 TGIF 与 smad2 的结合^[15]. TGIF 功能的增强可能抑制 TGF- β 对细胞的负性调节作用. 为探讨 TGIF 在肿瘤发生中的作用, 我们利用 TGIF 反义寡核苷酸转染胃癌细胞 SGC-7901, 观察他对该细胞增生和凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌细胞系 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞库, TGF- β 1 购自 Sigma 公司, TGIF 反义寡核苷酸和突变寡核苷酸参照文献 (Wotton D, et al, *Cell* 1999; 97:29-39) 由上海生物工程技术有限公司合成, 各

碱基均用硫代磷酸化法修饰. 脂质体 Lipofectin, Trizol 和 RPMI 1640 购自 Invitrogen 公司. 超级小牛血清购自杭州四季青公司, RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司, TGIF 和 β -actin 扩增引物(表 1)由软件 Primer Premier 5.0 设计, 由上海生物工程技术服务有限公司合成.

1.2 方法 将细胞接种于含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 在含 50 mL/L CO_2 空气的饱和湿度培养箱 37℃ 连续培养. 实验用细胞均处于对数生长期. TGIF 反义寡核苷酸转染前 1 d, 接种 SGC-7901 细胞至 96 孔板中(3×10^3 个/孔)或 50 mL 培养瓶中(5×10^5 个/瓶)贴壁培养 18 h, 无血清培养基洗涤细胞 2 次, 转染按 lipofectin 说明书进行, 最终每孔或每瓶分别转染 0.5 或 5 μg 寡核苷酸, 实验共分 3 组, 即 TGIF 反义寡核苷酸转染组、突变寡核苷酸转染组和未转染组. 转染 6 h 后, 弃转染液. 无血清培养基洗涤细胞 2 次, 各组细胞换用正常培养液或含 TGF- β 1 (10 $\mu\text{g/L}$)的培养液继续培养. 按 Trizol 说明书提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的提取质量, 核酸分析仪测定 RNA 含量, 2 μg 总 RNA 按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链. 再取 cDNA 2 μL 进行 PCR 扩增, PCR 反应体系: 亚沸水 35.5 μL , 10 \times buffer 5 μL , MgCl_2 4 μL (25 mmol/L), dNTP 1 μL (200 $\mu\text{mol/L}$), 引物各 1 μL (0.1 $\mu\text{mol/L}$), Taq 酶 0.5 μL (2 Mu/L), 混匀后加入 50 μL 矿物油, 点离心. 95℃ 变性 10 min, 扩增 35 个循环(97℃ 50 s, 62℃ 90 s, 72℃ 90 s), 第 5 循环结束后, 加 β -actin 引物(0.1 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL 继续扩增, 最后延伸 10 min. MTT 法检测细胞的增生速度换用正常培养液或含 TGF- β 1 (10 $\mu\text{g/L}$)的培养液培养 24 h、48 h 和 72 h 后, 加 5 g/L 的 MTT 20 μL 于各组中(4 孔/组), 继续培养 4 h 后弃板中的培养液, 各孔加 DMSO 150 μL , 轻轻振动后用酶标仪(波长 490 nm)测定各孔的 A 值. 流式细胞术分析细胞周期和凋亡. 在换用正常培养液或含 TGF- β 1 (10 $\mu\text{g/L}$)的培养液培养 48 h 后, 0.2 g/L EDTA 和 2.5 g/L 胰酶消化并收集细胞, PBS 洗涤 2 次, 750 mL/L 乙醇 4℃ 固定, 流式细胞仪测定各组细胞的 DNA 含量, Cell Quest 软件分析细胞群体的周期分布和凋亡.

2 结果

2.1 TGIF 反义寡核苷酸转染对 TGIF 表达的影响 经 RT-PCR 分析发现 SGC-7901 细胞转染 TGIF 反义寡核苷酸后, TGIF mRNA 表达明显减少(图 1), TGIF 反义寡核苷酸能抑制 TGIF 的表达.

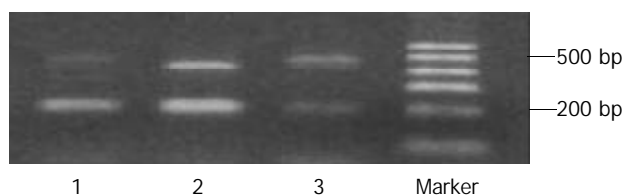


图 1 TGIF 反义寡核苷酸转染 SGC-7901 细胞 24 h 后 RT-PCR 分析. 1: TGIF 反义寡核苷酸; 2: 突变寡核苷酸; 3: 阴性对照; 前带 β -actin, 204 bp; 后带 TGIF, 420 bp.

表 1 TGIF 和 β -actin 的扩增引物序列

引物	序列	长度(bp)
TGIF	上游 5' -GAGAAGGAGAAGGGGCAACCTA-3'	420
	下游 5' -TGGCAGATCACTGATGGACG-3'	
β -actin	上游 5' -CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT-3'	204
	下游 5' -GGAGCAATGATCTTGATCTT-3'	

2.2 TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞生长的影响

TGIF 反义寡核苷酸转染细胞后, SGC-7901 细胞 24 和 48 h 的生长速度出现一定程度的抑制, 72 h 后, TGIF 反义寡核苷酸转染细胞的生长抑制率达 20.4% (较未转染细胞)(图 2). TGF- β 1 处理后, 各组细胞生长速度均明显减慢(图 3), 且 TGIF 反义寡核苷酸转染细胞的生长速度较突变组和未转染组明显减慢, 72 h 后, TGIF 反义寡核苷酸转染细胞的生长抑制率达 30% (较未转染细胞).

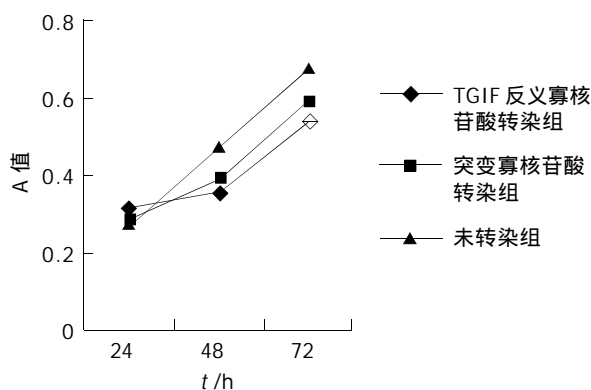


图 2 TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞生长的影响.

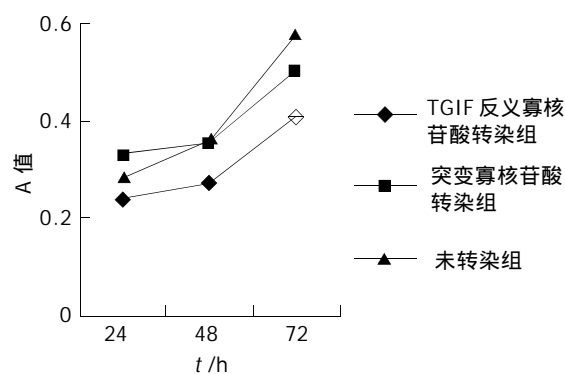


图 3 TGF- β 1 处理后, TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞生长的影响.

2.3 TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞周期的影响

TGIF 反义寡核苷酸转染后, 流式细胞术分析 3 组细胞的细胞周期分布未见明显差别(表 2); TGF- β 1 处理后, TGIF 反义寡核苷酸转染组的 G1 期细胞含量由 49% 增加到 58%, 较未转染组和突变寡核苷酸转染组的 G1 期细胞含量增加更明显.

2.4 TGIF 反义寡核苷酸对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

TGIF 反义寡核苷酸转染组与突变寡核苷酸转染组和未转染组 3 组间细胞凋亡率未见明显差别; TGF- β 1 处理

后, 各组细胞的凋亡率无明显差别.

表2 TGIF 反义寡核苷酸对细胞周期的影响

	反义TGIF转染组		突变寡核苷酸转染组		未转染组	
	TGF- β 1(+)	TGF- β 1(-)	TGF- β 1(+)	TGF- β 1(-)	TGF- β 1(+)	TGF- β 1(-)
G1	0.58	0.49	0.53	0.47	0.56	0.49
G2	0.08	0.11	0.9	0.14	0.08	0.13
S	0.34	0.40	0.38	0.39	0.36	0.39

3 讨论

众所周知, TGF- β 是一类能抑制上皮细胞生长的细胞因子, 肿瘤细胞常常逃逸 TGF- β 介导的生长抑制作用. TGIF 是 TGF- β 和视黄醛^[16]信号传导通路的抑制分子, Nakakuki et al^[17]发现在食管癌细胞系中有 TGIF 基因的扩增, Luo et al^[18]发现在卵巢癌患者的血清中存在针对 TGIF 的抗体. 他在肿瘤中的作用引起了我们的极大兴趣. 我们推测 TGIF 反义寡核苷酸可能通过拮抗 TGIF 对 TGF- β 和视黄醛信号传导通路的抑制作用, 从而部分逆转胃癌细胞的生物学行为. 但 TGIF 反义寡核苷酸转染 SGC-7901 细胞后, 他的生长速度无明显减慢, 细胞周期分布也无明显改变, 这可能是由于 SGC-7901 细胞在缺乏外源性 TGF- β 1 时, TGF- β 信号通路处于未激活状态所致. 他同时提示我们反义 TGIF 可能不能逆转胃癌细胞的恶性生长特点.

TGF- β 1 作用后, TGIF 反义寡核苷酸组细胞较突变组和未转染组细胞的生长速度明显减慢, 流式细胞术分析也表明 TGIF 反义寡核苷酸转染细胞的 G1 期细胞含量较突变寡核苷酸组和未转染组明显增多. Lo et al^[14]的研究报道与我们的结果一致, 他利用碘化脱氧尿嘧啶吸收试验, 发现稳定转染 TGIF 基因的 HaCaT 细胞能拮抗 TGF- β 介导的生长抑制作用.

乔文 et al^[19]发现 TGF- β 1 能明显诱导 SGC-7901 细胞的凋亡, 但我们多次流式细胞分析均表明 TGF- β 1 不能明显诱导 SGC-7901 细胞的凋亡. TGIF 反义寡核苷酸转染后, 胃癌细胞的凋亡没有明显改变; TGF- β 1 作用后, 他的凋亡率也无明显改变. 这很可能是由于 SGC-7901 细胞本身对 TGF- β 1 介导的细胞凋亡不敏感, 导致 TGIF 反义寡核苷酸不能通过拮抗 TGIF 而增强 TGF- β 对该细胞的凋亡诱导作用. TGIF 是否能抑制 TGF- β 诱导的细胞凋亡作用有待进一步的研究.

因此, 我们在胃癌细胞 SGC-7901 中证明 TGIF 不能抑制他的增生和诱导他的凋亡, 但能抑制 TGF- β 对该细胞生长和细胞周期的负调控作用, 最近, Chen et al^[20]发现 TGF- β 能诱导 TGIF mRNA 表达上调. 有趣的是: 多数肿瘤细胞和间质细胞能分泌 TGF- β , 这些肿瘤细胞有可能利用 TGIF 甚至少量 TGIF, 抑制 TGF- β 对自身的

生长抑制作用, 从而促进肿瘤的发生与发展, 甚至导致肿瘤的转移.

4 参考文献

- 于君, 沈祖尧. 幽门螺杆菌感染所致胃黏膜分子生物学行为改变在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2002;10:499-502
- 房殿春. 基因不稳定性在胃癌发生中的作用. 世界华人消化杂志 2003;11:1-5
- 孙喜文, 申宝忠, 石美森, 戴旭东. CD44v6 基因表达与胃癌危险因素的关系. 世界华人消化杂志 2002;10:1129-1132
- Fang DC, Luo YH, Yang SM, Li XA, Ling XL, Fang L. Mutation analysis of APC gene in gastric cancer with microsatellite instability. *World J Gastroenterol* 2002;8:787-791
- Zhang S, Li L, Lin JY, Lin H. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:899-904
- Zhao GH, Li TC, Shi LH, Xia YB, Lu LM, Huang WB, Sun HL, Zhang YS. Relationship between inactivation of p16 gene and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:905-909
- Zheng HC, Li YL, Sun JM, Yang XF, Li XH, Jiang WG, Zhang YC, Xin Y. Growth, invasion, metastasis, differentiation, angiogenesis and apoptosis of gastric cancer regulated by expression of PTEN encoding products. *World J Gastroenterol* 2003;9:1662-1666
- 万顺梅, 孙少华, 邓明德, 葛勤利, 杨玉捷. 胃癌组织中转化生长因子和血小板源生长因子表达的意义. 世界华人消化杂志 2002;10:36-39
- Wieser R. The transforming growth factor-beta signaling pathway in tumorigenesis. *Curr Opin Oncol* 2001;13:70-77
- Wotton D, Lo RS, Lee S, Massague J. A Smad transcriptional corepressor. *Cell* 1999;97:29-39
- Melhuish TA, Wotton D. The interaction of the carboxyl terminus-binding protein with the Smad corepressor TGIF is disrupted by a holoprosencephaly mutation in TGIF. *J Biol Chem* 2000;275:39762-39766
- Wotton D, Knoepfler PS, Laherty CD, Eisenman RN, Massague J. The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ* 2001;12:457-463
- Wotton D, Lo RS, Swaby LA, Massague J. Multiple modes of repression by the Smad transcriptional corepressor TGIF. *J Biol Chem* 1999;274:37105-37110
- Lo RS, Wotton D, Massague J. Epidermal growth factor signaling via Ras controls the Smad transcriptional co-repressor TGIF. *EMBO J* 2001;20:128-136
- Pessah M, Prunier C, Marais J, Ferrand N, Mazars A, Lallemand F, Gauthier JM, Atfi A. c-Jun interacts with the corepressor TG-interacting factor (TGIF) to suppress Smad2 transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6198-6203
- Bertolino E, Reimund B, Wildt-Perinic D, Clerc RG. A novel homeobox protein which recognizes a TGT core and functionally interferes with a retinoid-responsive motif. *J Biol Chem* 1995;270:31178-31188
- Nakakuki K, Imoto I, Pimkhaokham A, Fukuda Y, Shimada Y, Imamura M, Amagasa T, Inazawa J. Novel targets for the 18p11.3 amplification frequently observed in esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2002;23:19-24
- Luo LY, Herrera I, Soosaipillai A, Diamandis EP. Identification of heat shock protein 90 and other proteins as tumour antigens by serological screening of an ovarian carcinoma expression library. *Br J Cancer* 2002;87:339-343
- 乔文, 胡家露. 转化生长因子 β 对胰腺癌细胞凋亡诱导的研究. 解放军医学杂志 1997;22:338-340
- Chen F, Ogawa K, Nagarajan RP, Zhang M, Kuang C, Chen Y. Regulation of TG-interacting factor by transforming growth factor-beta. *Biochem J* 2003;371(Pt 2):257-263